

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. BÜCHER

**Versuch einer Differenzierung von roten und
weißen Skelettmuskeln aufgrund ihres
metabolischen Verhaltens am Beispiel des
M. adductor magnus und des M. semitendinosus
des Hauskaninchens**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität München

vorgelegt von

UWE KRIEG

München 1967

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. BÜCHER

**Versuch einer Differenzierung von roten und
weißen Skelettmuskeln aufgrund ihres
metabolischen Verhaltens am Beispiel des
M. adductor magnus und des M. semitendinosus
des Hauskaninchens**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität München

vorgelegt von

UWE KRIEG

München 1967



Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Theodor BÜCHER

Dekan: Prof. Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1967

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

Einleitung	Seite	1
Ergebnisse	"	4
Anatomische Untersuchungen	"	4
Bewegungen der Metabolitgehalte	"	6
Methodik	"	27
Zusammenfassung	"	36
Literaturverzeichnis	"	38

A b k ü r z u n g e n

ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
C	=	Kreatin
CP	=	Kreatinphosphat
DAP	=	Dihydroxyazetonphosphat
1,3Di-PGS	=	1,3-Diphosphoglyzerinsäure
DPN ⁺	=	Diphosphopyridinnukleotid (oxydierte Form)
DPNH	=	Diphosphopyridinnukleotid (reduzierte Form)
FDP	=	Fruktose-1,6-diphosphat
F6P	=	Fruktose-6-phosphat
F6PK	=	Fruktose-6-phosphatkinase
GAP	=	Glyzeraldehyd-3-phosphat
GAPDH	=	Glyzeraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
G-D	=	Glyzerin-1-phosphat - Dihydroxyazetonphosphat
GDH	=	Glyzerin-1-phosphatdehydrogenase
GluDH	=	Glutamatdehydrogenase
GOT	=	Glutamat-oxalazetat-transaminase
G6P	=	Glukose-6-phosphat
GPOX	=	Glyzerin-1-phosphatoxydase
GPT	=	Glutamat-pyruvat-transaminase
HK	=	Hexokinase
L-P	=	Laktat-Pyruvat
mMol/h.gFr.	=	mMol pro Stunde und g Frischgewicht
Pa	=	anorganisches Phosphat
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
PGK	=	3-Phosphoglyzerinsäurekinase
2-PGS	=	2-Phosphoglyzerinsäure
3-PGS	=	3-Phosphoglyzerinsäure
PH	=	Phosphorylase

Einleitung

Die ersten grundlegenden Arbeiten über rote und weiße Skelettmuskeln stammen von RANVIER [41, Übersicht s. 37]. Er entdeckte, daß sich weiße Muskeln rasch, aber kurz kontrahieren, rote Muskeln langsamer reagieren, jedoch länger verkürzt bleiben [vgl. auch 4, 18]. Histologisch fand RANVIER eine stärkere Kapillarisation sowie besondere Gefäßstrukturen im roten Muskel [vgl. auch 19, 33, 45, 48]. Als Ursache für den Farbunterschied erkannte er einen unterschiedlichen Gehalt an Myoglobin.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurden zahlreiche Einzelbefunde erhoben, obwohl keiner der späteren Untersucher die Konsequenz und Breite RANVIERS erreicht hat. Ihre wichtigsten vergleichend biochemischen Beobachtungen an roten und weißen Muskeln sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

GLEISS	[17]	Weißer Muskeln bilden mehr Säure als
FLETCHER	[16]	rote. Starke Milchsäurebildung, auch
DOMONKOS	[11]	aerob, im weißen Muskel, geringe im
BEATTY et al.	[2]	roten.
BATTELLI und STERN	[1]	Rote Muskeln oxydieren Succinat dreimal schneller als weiße.
DOMONKOS und LATZKOVITS	[12]	Größere Sauerstoffaufnahme des roten als des weißen Muskels.
BEATTY et al.	[2]	
LAWRIE	[31, 32]	Parallelität zwischen Myoglobinkonzentration einerseits und Fähigkeit zur aeroben Synthese energiereichen Phosphats sowie Aktivität des Cytochromsystems andererseits.
MIRSKI und WERTHEIMER	[35]	Höhere Phosphorylaseaktivität im weißen als im roten Muskel.
NOLL und BECKER	[36]	Mehr Glykogen im roten als im weißen Muskel.
BEATTY et al.	[2]	
DAVEY	[9, 10]	Reichlich Anserin und etwas Carnosin in weißen Kaninchenmuskeln, nur von Anserin Spuren im roten Semitendinosus.

Tab. 1

Mit dem Gefäßreichtum des roten Muskels geht eine stärkere Ausbildung des interstitiellen Bindegewebes einher.

WEBER und MEYER [49] bestimmten das Stromaprotein im roten Muskel zu 27 %, im weißen Muskel zu 17 % vom Gesamtprotein. Nach PETTE und BÜCHER [40] enthalten der rote Muskel 33 mg, der weiße Muskel 55 mg leicht extrahierbaren extramitochondrialen Proteins pro g Frischgewicht.

KRÜGER [29, 30] unterscheidet histologisch zwischen Muskelfasern mit "Felderstruktur", ("tonische Fasern"), und Fasern mit "Fibrillenstruktur", ("tetanische Fasern"). Als wichtigstes seiner Ergebnisse ist anzuführen, daß die meisten Skelettmuskeln gleich-

zeitig aus tetanischen und tonischen Fasern aufgebaut sind.

Wie PETTE und BÜCHER [40] gezeigt haben, liefern vollständige Enzymaktivitätsmuster das brauchbarste Kriterium zur Erfassung der Art und des Ausmaßes der Differenzierung von Skelettmuskeln. Bei identischem Plan der Organisation können charakteristische Proportionen um Größenordnungen differieren. Wahrscheinlich existieren so viele spezifische Proportionen, wie der Bewegungsapparat Skelettmuskeln enthält. Jedoch gibt es Extreme der Differenzierung, die z. B. in einigen roten und weißen Skelettmuskeln des Kaninchens verwirklicht sind.

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, an solchen Extremen die Bedeutung der Differenzierung enzymatischer Proportionen für die Differenzierung des metabolischen Verhaltens zu studieren. Untersucht wurde die Stoffwechseldynamik im Bereich des energieliefernden Stoffwechsels vom weißen M. adductor magnus und roten M. semitendinosus des Hauskaninchens. Bei der verwendeten Rasse "Deutsche Widder" ist die Differenzierung dieser beiden Muskeln noch ausgeprägter als bei anderen Rassen.

Die methodischen Vorarbeiten waren umfangreicher, als sich vorsehen ließ. Daher konnten die Metabolitbewegungen nicht in der vorgesehenen Ausführlichkeit studiert werden. Aus den vorliegenden Daten läßt sich dennoch zwanglos herauslesen, daß zwischen Adductor magnus und Semitendinosus metabolische Unterschiede bestehen, die schon fast das Qualitative betreffen.

E r g e b n i s s e

a) Anatomische Untersuchungen

Bei der Präparation von Adductor magnus und Semitendinosus sieht man eine dichte Folge von Gefäßen zwischen beiden Muskeln verlaufen. Um die Bedeutung dieser Gefäße zu studieren, wurden anatomische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die Beinarterien von der Bauchaorta aus mit einer erstarrenden Masse injiziert. Eine retrograde Injektion der Venen ist nicht möglich, da sie nach SPALTEHOLZ [46] bis in die feinsten Verzweigungen mit Klappen versehen sind.

Das Berlinerblau-Gelatine-Verfahren [47] sowie die Injektion mit Plastoid [44] erwiesen sich als nicht geeignet für den beabsichtigten Zweck.

Eine geradezu ideale Injektionsmasse wurde im "Silopren K 1", einem Siloprenkautschuk, gefunden, einer Masse, die in den Gefäßen zu kautschukartiger Konsistenz polymerisiert. Eine genaue Beschreibung des Verfahrens findet sich bei H.-R. DUNCKER [13] und H.-R. DUNCKER u. O. SCHLÜTER [14]. Nach Formolhärtung des Gewebes wurden die injizierten Gefäße freipräpariert. An den so gewonnenen Präparaten konnten die Befunde von R.D. SMITH und R.P. GIOVACCHINI [45] über die Gefäßversorgung einiger roter und weißer Muskeln des Kaninchens, die nach Tuscheinjektion der Gefäße erhoben wurden, im wesentlichen bestätigt werden. Der Gefäßverlauf wurde an sechs Präparaten studiert.

Hauptversorgungsarterie für beide Muskeln ist die A. profunda femoris (Abb. 1). Sie verläuft in der Tiefe des Adductor magnus und überquert den Semitendinosus zwischen proximalem Drittel und den distalen zwei Dritteln auf der Innenseite. Nur wenige Äste gehen an dieser Kreuzungsstelle zum Semitendinosus ab. Zur Hauptsache erhält der rote Muskel Blut von Arterienästen, die von der

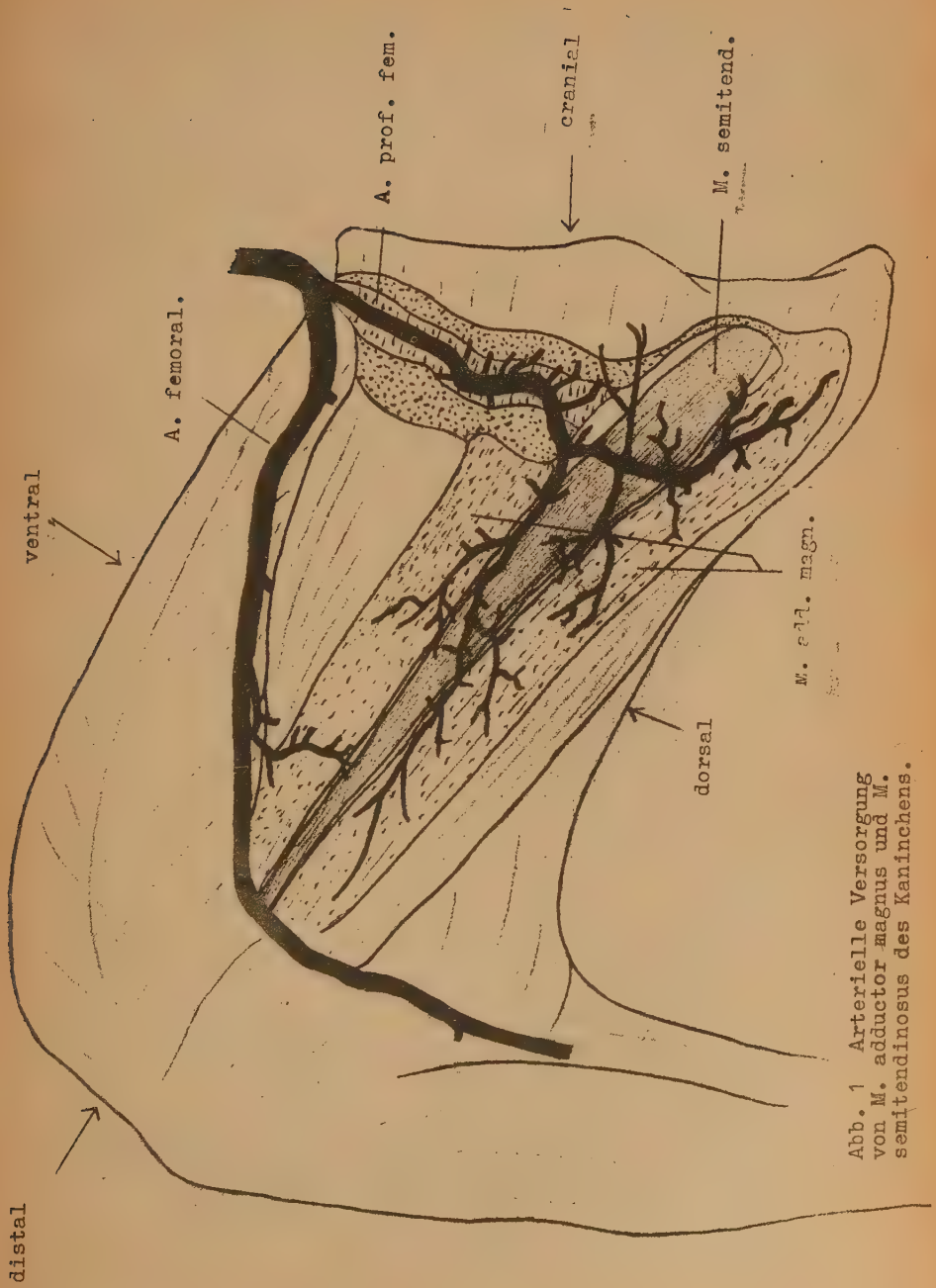


Abb. 1 Arterielle Versorgung von M. adductor magnus und M. semitendinosus des Kaninchens.

A. profunda femoris abzweigen, parallel zur Faserrichtung im Adductor magnus verlaufen und beide Muskeln versorgen. Vor Eintritt in den Semitendinosus zweigen sich die Äste weiter auf, so daß vielfach mehr als 20 kleine Arterien entlang des ganzen Verlaufs in ihn eindringen. Diese vielen Gefäße sieht man, wie oben erwähnt, bei der Operation zwischen weißem und rotem Muskel verlaufen. Nach R.D. SMITH und R.P. GIOACCHINI [45] ist diese Art der Gefäßversorgung typisch für rote Kaninchenmuskeln, während in den weißen Muskel nur ein oder zwei größere Gefäße unverzweigt eintreten und sich erst danach zur Versorgung der verschiedenen Muskelteile verzweigen.

Die beschriebene Gefäßversorgung von Adductor und Semitendinosus zeigt mancherlei Variationen bei einzelnen Kaninchen, ja auch bei beiden Beinen desselben Tieres. So wird in den meisten Fällen der distale Anteil des Adductor magnus von einem kleinen Seitenast der A. femoris versorgt. Von ihm gehen i.a. 1 bis 2 kleine Äste zum distalen Ende des Semitendinosus. Dieser Ast der A. femoris kann aber auch viel stärker sein und etwa dem ganzen distalen Drittel des Semitendinosus Blut zuführen. In einem Fall wurde der Semitendinosus von der A. profunda femoris nicht auf der Innenseite, sondern auf der Außenseite des Muskels überkreuzt.

b) Bewegungen der Metabolitgehalte

Die verwerteten Ergebnisse stammen aus den Untersuchungen an sechs Kaninchen. Bei jedem Kaninchen wurden die Muskeln beider Beine in gleicher Weise präpariert. In jedem Falle erfolgte die Entnahme von einem Bein als Kontrollwert in Ruhe, danach von dem anderen Bein nach verschieden langer tetanischer Reizung. Mit Reizbeginn wurden A. und V. femoralis abgeklipmt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Versuche. Eine Übersicht über sämtliche Werte findet sich in Tabelle 3.

Tab. 3 (siehe S. 8): Übersicht über die Metabolitgehalte und -quotienten in der Kontrolle im roten und weißen Kaninchenmuskel und nach verschieden langer Reizdauer.
MW = Mittelwert, n = Zahl der Versuche, s = Standardabweichung vom Mittelwert (in vom Hundert).
Angaben in nMol/g Frischgewicht.

Versuch	Geschlecht	Reizdauer	Narkose	Bemerkungen
1	w.	10"	Urethan	-
2	m.	11"	Urethan	-
3	m.	20"	Urethan	roter Kontrollwert nicht verwertbar, da kein reiner Ruhewert: Zange abgerutscht und nur wenig Muskel gefaßt
4	w.	20"	Äther- Lachgas- Succinyl- cholin- Atropin	s.u.
5	m.	20"	Urethan	-
6	w.	30"	Urethan	-

Tab. 2

Die energiereichen Phosphate wurden nur bei den Versuchen 2, 3 und 6 bestimmt.

Die Reizwerte von Versuch 4 liegen sehr niedrig. Wir führen das auf die besonderen Narkosebedingungen, insbesondere die Verwendung von Succinylcholin, zurück, durch die eine maximale Reizung des Muskels nicht möglich war. Auf die Reizwerte von Versuch 4 wurde deshalb verzichtet.

Extramitochondriale Redoxsysteme

Abb. 2 demonstriert das sehr unterschiedliche Verhalten der Systeme Laktat-Pyruvat (L-P) und Glycerin-1-phosphat-Dihydroxyazetonphosphat (G-D) in rotem und weißem Muskel. Die Kontrollwerte sind auf der Ordinate aufgetragen. Die Redoxpotentiale von L-P und G-D wurden nach den bei BÜCHER [6] angegebenen Formeln berechnet. Die Mittelwerte von Laktat, Pyruvat und Glycerin-1-phosphat sind als Säulen eingetragen.

Muskel	Reiz- dauer	L	P	L/P	G	D	G/D	GAP	FDP	G6P	F6P	DAP/GAP	
M. semi- tendinosus (rot)	Kon- trolle	MW	4900	148	33	280	17	16	1,9	18	1900	500	6,5
		n	5	5	5	5	5	4	5	5	5	4	
	s(%)	21	32	48	47	41	29	39	64	15	15	39	
	10sec	MW	6100	73	83	510	73	7,7	7,0	152	1690	430	11,0
		n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	20sec	MW	5800	42	139	1370	280	5,0	28	390	1560	350	10,2
		n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	30sec	MW	7500	115	65	390	87	4,4	14	200	1750	270	6,2
		n	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	M. adductor magnus (weiß)	Kon- trolle	MW	9700	540	17,9	980	81	12,1	8	660	1400	200
		n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
s(%)		28	31	32	22	32	27	27	108	69	75	7,4	
10sec		MW	18700	780	24	1200	126	9,0	7,7	910	3300	550	12,8
		n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
20sec		MW	21700	930	24	1480	70	23	7,0	250	3800	550	12,6
		n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
30sec		MW	27700	1160	24	1670	37	45	11,3	200	3300	470	5,7
		n	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
M. semi- tendinosus (rot)		Kon- trolle	MW	0,036	0,26	5,3	2,1	2,5	3000	940	6500	8800	3,1
		n	5	5	5	5	5	2	2	2	2	2	
	s(%)	58	8	18	19	10	-	-	-	-	-	-	
	10sec	MW	0,37	0,25	10,4	5,5	1,9	2400	770	10800	7200	3,1	0,67
		n	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	
	20sec	MW	1,14	0,22	18,8	9,1	2,0	3100	-	-	-	-	-
		n	2	2	2	2	2	1	-	-	-	-	-
	30sec	MW	0,69	0,15	22	11,7	1,9	2800	920	10200	7200	3,0	0,7
		n	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	M. adductor magnus (weiß)	Kon- trolle	MW	8	0,14	39	15	2,6	5900	1270	17100	25000	5,3
		n	6	6	6	6	6	3	3	3	3	3	3
s(%)		139	9	79	73	24	20	38	5	17	17	15	15
10sec		MW	2,2	0,17	67	31	2,2	5500	1070	31000	14100	5,1	0,45
		n	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
20sec		MW	0,46	0,15	23	14,0	1,9	7800	2200	30000	14000	3,6	0,46
		n	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
30sec		MW	0,42	0,14	21	11,6	1,8	6000	1240	27000	7800	4,8	0,29
		n	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1

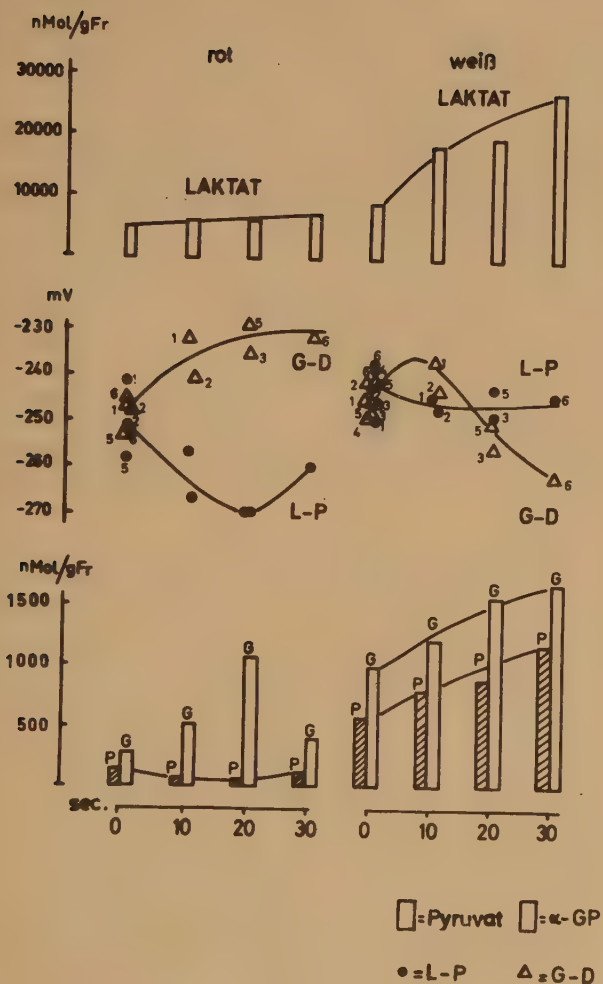


Abb. 2 Bewegungen der Gehalte von Laktat, Pyruvat und Glyzerin-1-phosphat und der Redoxpotentiale von Laktat-Pyruvat (L-P) und Glyzerin-1-phosphat-Dihydroxyacetonphosphat (G-D) bei verschiedenen langer tetanischer Reizung in rotem und weissen Kaninchen-muskel. Kontrollwerte auf der Ordinate. Abszisse = Reizdauer.

Während der Pyruvatgehalt im weißen Muskel bei Reizung ständig ansteigt, nach 30 Sekunden auf mehr als das Doppelte der Kontrolle, sinkt er im roten Muskel in 20 Sekunden auf ein Drittel ab, um erst danach wieder anzusteigen, nach 30 Sekunden auf gut zwei Drittel des Kontrollwertes.

Bereits die Pyruvatwerte der Kontrolle sind im weißen Muskel fast viermal so groß wie im roten. Auch die Kontrollen von Laktat, Glyzerin-1-phosphat und Dihydroxyazetonphosphat liegen im weißen sehr viel höher als im roten Muskel. Zumindest teilweise sind diese Differenzen der Ausgangswerte darauf zurückzuführen, daß sich der weiße Kontrollmuskel schon in einem deutlich gereizten Zustand befindet (vgl. unten).

Glyzerin-1-phosphat steigt im weißen Muskel etwa parallel mit dem Pyruvat an. Im roten Muskel folgt einer starken Zunahme des Gehaltes in 20 Sekunden ein steiler Abfall zwischen der 20. und 30. Sekunde.

Die Dihydroxyazetonphosphat-Gehalte bewegen sich im roten Muskel bei Reizung stark. Sie steigen in den ersten 20 Sekunden des Tetanus steil an und fallen dann bis zur 30. Sekunde wieder steil ab (Abb. 3). Die Bewegungen im weißen Muskel sind vergleichsweise gering.

Bei den Kontrollwerten liegen die Redoxpotentiale von L-P und G-D eng zusammen (Abb. 2), im roten Muskel ist G-D einige mV positiver, im weißen Muskel einige mV negativer als L-P. Dieser Befund ist besonders interessant, wenn man mit ihm HOHORSTs Ergebnisse am Bauchdeckenmuskel der Ratte [21] vergleicht. HOHORST findet in Ruhe mit -231 mV für G-D ein sehr viel positiveres Potential als für L-P mit -245 mV. Er hat daraus den Schluß gezogen, daß eine Kompartimentierung besteht. Unsere Ergebnisse machen eine solche Annahme nicht notwendig. Verlängert man die Kinetiken von L-P und G-D in Abb. 2 beim roten Muskel über die Startlinie hinaus nur wenig, so schneiden sie sich, vielleicht

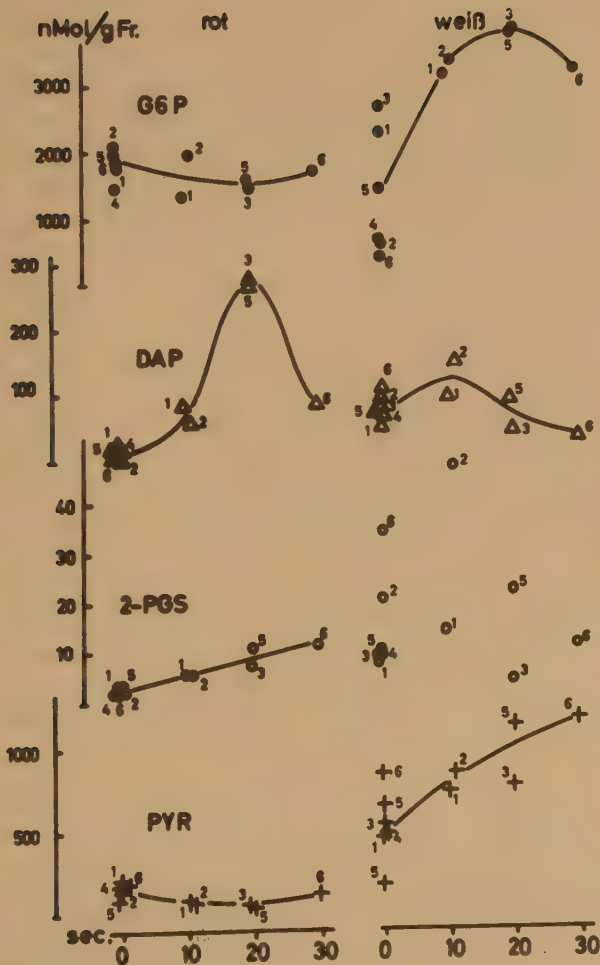


Abb. 3 . Bewegungen der Gehalte von Glukose-6-phosphat, Dihydroxyacetonephosphat, 2-Phosphoglyzerinsäure und Pyruvat bei verschiedenen langer tetanischer Reizung in rotem und weißem Kaninchenmuskel. Kontrollwerte auf der Ordinate. Abszisse = Reizdauer.

ein Zeichen dafür, daß auch die Kontrollwerte des roten Muskels nicht ganz dem wirklichen Ruhestatus entsprechen. Man muß wohl annehmen, daß bei HOHORSTs "Ruhewerten" der Muskel schon stärker gereizt war.

Das relativ niedrige Potential der Systeme L-P und G-D im roten Muskel kann neben der Größe des Quotienten FDP/F6P (s. u.) als Kriterium für einen Kontrollstatus angesehen werden, der dem wahren Ruhestatus nahekommt. (Weiter unten wird erläutert werden, daß die Drosselung der Atemkette in Ruhe zu einer Negativierung des Wasserstoffpotentials im cytoplasmatischen Raum führt.)

Es ist anzunehmen, daß der weiße Muskel im Kontrollstatus schon etwas gereizt ist (s. u.). Die Potentiale von L-P und G-D der Kontrolle entsprechen also auch schon nicht mehr dem Ruhestatus. Wenn man annimmt, daß beim weißen Muskel im Ruhestatus ähnliche Verhältnisse bestehen wie beim roten Muskel, dann kommt dem Ruhestatus des weißen Muskels die Kontrolle des Versuches 1 am nächsten. Die Potentiale L-P (-249 mV) und G-D (-245 mV) liegen hier ähnlich wie die entsprechenden Potentiale im Semitendinosus, sowohl was die Höhe als auch das Verhältnis von L-P und G-D angeht. In Übereinstimmung damit ist in Versuch 1 der Kontrollquotient FDP/F6P der niedrigste im weißen Muskel, wie auch die Kontrollwerte von FDP, DAP, GAP, 2-PGS und PEP die niedrigsten der Versuche sind.

Ein Auseinanderweichen der Redoxpotentiale von L-P und G-D tritt bei den Kaninchenmuskeln erst im Tetanus ein (Abb. 2). Im roten Muskel steigt G-D innerhalb von 20 Sekunden Reizdauer von -248 mV auf -233 mV und bleibt auch nach 30 Sekunden auf dieser Höhe. Das L-P - Potential, das schon in der Kontrolle mit -251 mV relativ niedrig liegt, sinkt bei Reizung in 20 Sekunden auf -270 mV ab, um dann langsam wieder anzusteigen.

Im weißen Muskel sinkt das Potential von L-P im Tetanus höchstens geringfügig, im Mittel von -243 mV auf -246 mV. Im System

G-D kommt es nur vorübergehend in den ersten 10 Sekunden des Tetanus zu einer Positivierung, dann aber zu einer Negativierung des Potentials bis auf -262 mV nach 30 Sekunden. Die anfängliche Positivierung des G-D - Potentials ist vermutlich im wesentlichen Folge des Anschwellens des DAP - Gehaltes. Vielleicht zeigen sich darin auch zusätzlich die Auswirkungen einer initialen aeroben Phase, die aber wegen des geringen Myoglobingehaltes und damit der geringen Sauerstoffreserve des weißen Muskels nur kurz sein kann. In dieser Phase liegen möglicherweise auch HOHORSTs "Ruhewerte" [21].

HOHORST findet beim Rattenbauchdeckenmuskel im Tetanus [21] ähnliche Verhältnisse wie wir am weißen Kaninchenmuskel: relative Konstanz von L-P und starke Negativierung des G-D - Potentials.

Die Möglichkeit, daß sich L-P - und G-D - Potentiale unabhängig voneinander bewegen können, scheint charakteristisch für den Skelettmuskel zu sein. In der Leber [5, 6, 21, 23, 26, 42, 43] und im Herzen [25] bewegen sich dagegen beide Potentiale parallel.

Die Flußrate des Wasserstoffs in die Laktatbildung ist im Adductor magnus wesentlich größer als im Semitendinosus. Berechnet aus der Laktatanhäufung in 30 Sekunden beträgt sie in beiden Muskeln etwa 2,3 bzw. 0,3 mmol/h.gFr. Das Verhältnis beider Werte ist ungefähr das gleiche wie das der Enzymaktivitätsgehalte der EMBDEN-MEYERHOF-Kette in beiden Muskeln (Abb. 4).

Trotz des relativ geringen Laktatanstiegs erreicht infolge des Pyruvatabfalls im Semitendinosus das Potential des L-P - Systems mit -270 mV die niedrigsten bisher am Skelettmuskel gemessenen Werte. Im weißen Muskel dagegen bleibt das L-P - Potential fast innerhalb der Streuung der Kontrollwerte, obwohl sich der Laktatgehalt verdreifacht. Die Ursache dieser Konstanz ist der bereits erwähnte Zuwachs an Pyruvat während der Aktion. Aus den Säulen am Fuß der Abb. 2 erkennt man weiterhin einen Zuwachs an Glyzerophosphat, der demjenigen an Pyruvat entspricht. Diese Glyzerophos-

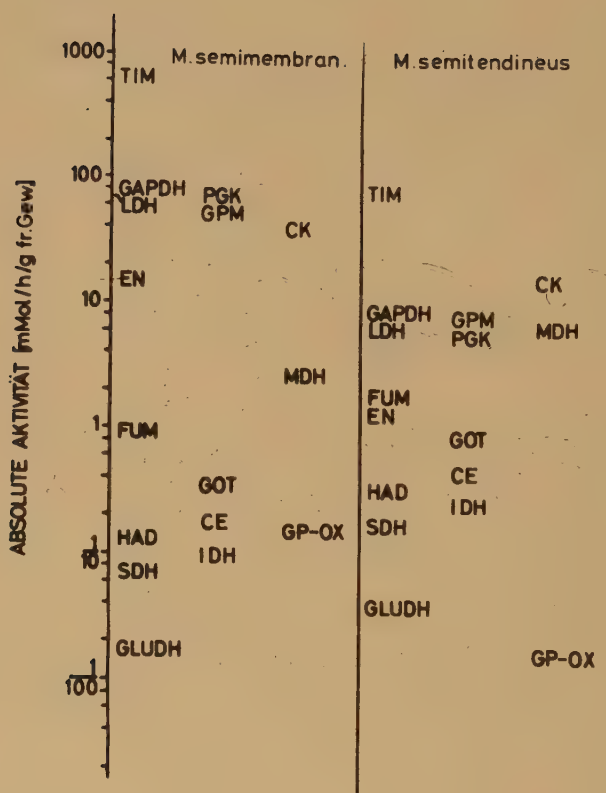


Abb. 4 Enzymaktivitätsmuster je eines weissen (links) und roten (rechts) Muskels der Hinterextremität des Kaninchens. Aufgetragen sind, aus 1 Gramm Frischgewicht extrahierbaren bzw. im Homogenatrückstand (SDH, GP-OX) gesteteten Aktivitäten von Enzymen der Glykolysekette, des Zitratzyklus und des Glykophosphat-Zyklus.

phat-Pyruvat-Dismutation [5, 6, 21, 26] ist offensichtlich für die Konstanz des L-P - Potentials im weißen Muskel verantwortlich. Der rote Muskel zeigt, zumindest im beobachteten Zeitraum und unter den Versuchsbedingungen, diesen Mechanismus nicht. Hier steht der Pyruvatspiegel vielmehr unter dem Regime des mitochondrialen Katabolismus. Der höhere Gehalt an Atmungskette sowie der höhere Vorrat an Sauerstoff sind die Ursachen dieser Diskrepanz zum weißen Muskel. Auch DOMONKOS [11] sah gegenüber dem weißen Muskel des Kaninchens eine nur sehr geringe Laktat- und Pyruvatbildung im roten Muskel, und DOMONKOS und LATZKOVITS [12] fanden, daß der rote Muskel 40 % mehr Pyruvat verarbeitet als der weiße Muskel.

Bezüglich des G-D - Potentials sind im wesentlichen drei verschiedene Einflüsse zu berücksichtigen:

1. Der mit Einsetzen der Reizung erfolgende Stoß von DAP (Abb. 3)

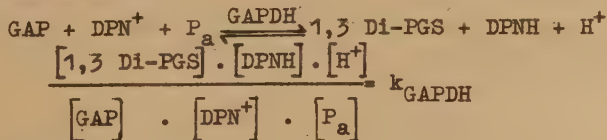
Dieser Stoß setzt das System

$$\frac{[aGP] \cdot [DPN^+]}{[DAP] \cdot [DPNH] \cdot [H^+]} = k_{GDH}$$

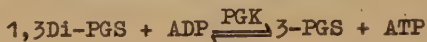
ins Ungleichgewicht und positiviert das G-D - Potential. Dabei spielt der Aktivitätsgehalt an GDH eine Rolle. Er entspricht im roten Muskel einer maximalen Flußrate von etwa 0,3 mMol/h.gFr, im weißen von 4 mMol/h.gFr. [40]. Aus dem Zuwachs an Glyzerin-1-phosphat im roten Muskel zwischen der 10. und 20. Sekunde (am Fuß der Abb. 2) errechnet sich eine Flußrate des Wasserstoffs in die Glyzerin-1-phosphatbildung von ca. 0,2 mMol H₂/h.gFr. Diese Flußrate erhöht sich noch um die Rate der gleichzeitig ablaufenden mitochondrialen Oxydation von Glyzerin-1-phosphat (s. unten).

2. Das Redoxpotential des extramitochondrialen DPN - (c-DPN) Systems

Es wird negativiert durch die Dehydrierung von Triosephosphat in der GAPDH-Reaktion:



Diese ist ihrerseits mit dem cytoplasmatischen ATP - (c-ATP) System über die PGK-Reaktion gekoppelt:



$$\frac{[3\text{-PGS}] \cdot [\text{ATP}]}{[1,3\text{Di-PGS}] \cdot [\text{ADP}]} = k_{\text{PGK}}$$

$$\frac{[3\text{-PGS}] \cdot [\text{DPNH}] \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{ATP}]}{[\text{GAP}] \cdot [\text{DPN}^+] \cdot [\text{P}_a] \cdot [\text{ADP}]} = k_{\text{GAPDH}} \cdot k_{\text{PGK}}$$

Daher steht das Redoxpotential des c-DPN - Systems unter dem Einfluß des c-ATP - Systems. HOHORST hat diesen Einfluß bei der Verfolgung der Metabolitmuster des Bauchdeckenmuskels und der Leber der Ratte aufgezeigt. Allerdings sind die Verhältnisse im Muskel durch eine wahrscheinlich bestehende Kompartimentierung von ATP und ADP kompliziert. Als Indikator für das Phosphatpotential hat er daher den Quotienten der Gehalte an Kreatinphosphat (CP) und Kreatin (C) herangezogen, als Indikator für das cytoplasmatische Wasserstoffpotential den Quotienten G/D [21]. Abb. 5 zeigt Analoges für unsere Versuche.

Trotz der geringen Zahl der Versuche ist im weißen Muskel eine ähnliche Beziehung zwischen dem Phosphat- und Wasserstoffpotential wie bei HOHORST angedeutet: eine, wenigstens im Beginn der Aktion, etwa lineare Abnahme des CP/C - Quotienten mit dem Anstieg von G/D, d. h. also: Erhöhung des Phosphatpotentials bedingt Positivierung des Wasserstoffpotentials und umgekehrt.

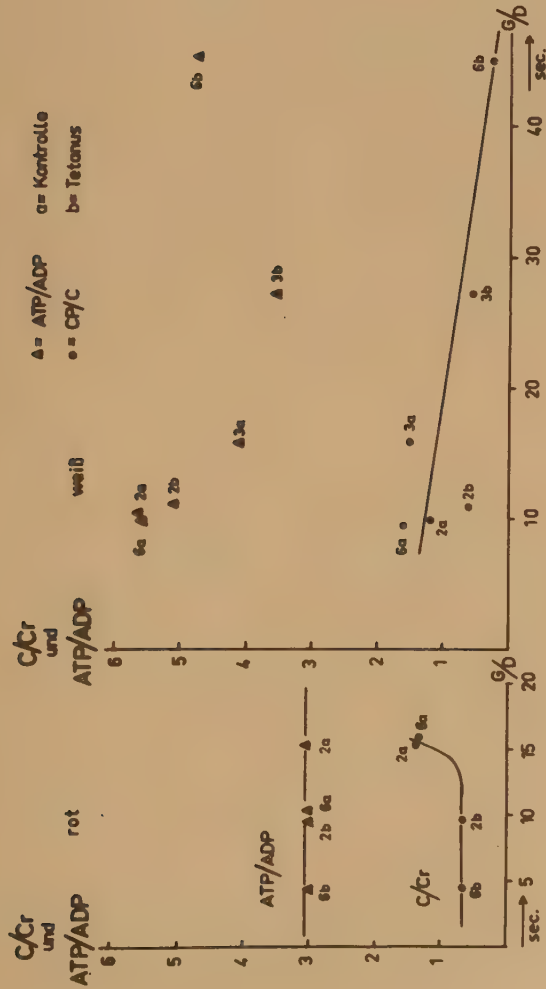
Im Falle des roten Muskels sind die Beziehungen anderer Art, da hier neben einem größenordnungsmäßig geringeren Gehalt der zusammenspielenden Enzymaktivitäten die Mitochondrien ins Spiel kommen (vgl. unter 3.)

3. Die Koppelung des G-D - Redoxsystems an die Atemkette über das MEYERHOF-GREEN-Enzym αGPOx

Die Einwirkung dieses Weges im roten Muskel erkennt man in Abb. 2 an der Abnahme des Glycerin-1-phosphat - Gehaltes zwischen der 20. und 30. Sekunde des Tetanus. Die Differenz der Werte entspricht einer Flußrate von 0,25 mmol/h.gFr. Wiederum handelt es sich um einen minimalen Wert, da der gleichzeitige Zufluß an Wasserstoff in das G-D - System unberücksichtigt blieb. Daß ein solcher Zufluß existieren muß, folgt aus dem wesentlich negativeren Potential des L-P - Systems bei gleichzeitiger Zunahme des Laktatgehaltes.

Diese Flußrate der αGPOx - Reaktion erscheint sehr hoch, wenn man sie mit den in vitro gemessenen Enzymaktivitäten von αGPOx im roten Muskel vergleicht [40]. Sollte sich in weiteren

Abb. 5 Phosphorylierungsstatus des energiereichen Phosphats und Reduktionsgrad des Systems (Glyzerin-1-phosphat/Dihydroxyacetonphosphat).



Versuchen eine solche Aktivität der α GPOx im roten Muskel bestätigen, so müßten die bisher in vitro gemessenen Aktivitäten von rund 20 $\mu\text{Mol/h.gFn}$ bei weitem zu niedrig sein.

Die Koppelung des G-D - Systems an die Atemkette bewirkt, daß sein Potential durch den Apparat der mitochondrialen Atmungskontrolle [27] beeinflußt wird: eine Erhöhung des Phosphatpotentials drosselt die respiratorische Aktivität und damit den Abfluß von Wasserstoff aus dem G-D - System. Eine Erhöhung des Phosphatpotentials (hohe Proportion CP/C) wirkt sich also hier in einer Negativierung des Wasserstoffpotentials aus.

Zweifellos ist der Status des c-ATP - Systems für das Potential des c-DPN - Systems dominierend. (Daneben spielt noch der Zu- und Abfluß von Wasserstoff aus anderen angekoppelten Redoxsystemen eine Rolle.) Diesen Einfluß auf das c-DPN - System übt das System des energiereichen Phosphats im aeroben Status vorwiegend über die mitochondriale Atmungskontrolle aus. Daher liegt das Wasserstoffpotential im Kontrollstatus vom roten Muskel relativ negativ, im roten Muskel während der Aktion (gemessen am Potential G-D), relativ positiv. (Der rote Muskel atmet in der beobachteten Zeit auch während der Aktion. Er verbraucht dabei wegen der Unterbindung der zuführenden Gefäße den an das Myoglobin gebundenen Sauerstoff [34].) Während der Anaerobiose beeinflußt das Phosphatpotential den Zustand des c-DPN - Systems über die GAPDH-Reaktion. Das ist im Tetanus beim weißen Muskel der Fall: Negativierung des Wasserstoff - (G-D -) Potentials.

Zwei-Partner-Reaktionen

Die vorliegenden Untersuchungen erstrecken sich auf drei Zwei-Partner-Reaktionen: $\text{G-6-P} \longleftrightarrow \text{F-6-P}$, $\text{DAP} \longleftrightarrow \text{GAP}$ und $2\text{-PGS} \longleftrightarrow \text{PEP} + \text{H}_2\text{O}$. Die Bewegungen der Gehaltsquotienten dieser Reaktionen bei Muskelarbeit sind in Abb. 6 dargestellt.

Diese Reaktionen repräsentieren "Gefällstrecken" [7] in der Stoffwechselkette. Theoretisch ist zu fordern, daß bei Steigerung des Durchflusses der Gehaltsquotient, der in Ruhe dem Gleichgewichtsquotienten angenähert ist, etwas absinkt [7]. HOHORSTs Untersuchungen am Rattenbauchdeckenmuskel [21] bestätigen diese Überlegungen.

Auch die am roten und weißen Kaninchenmuskel gefundenen Gehaltsquotienten der Zwei-Partner-Reaktionen verhalten sich in gleicher

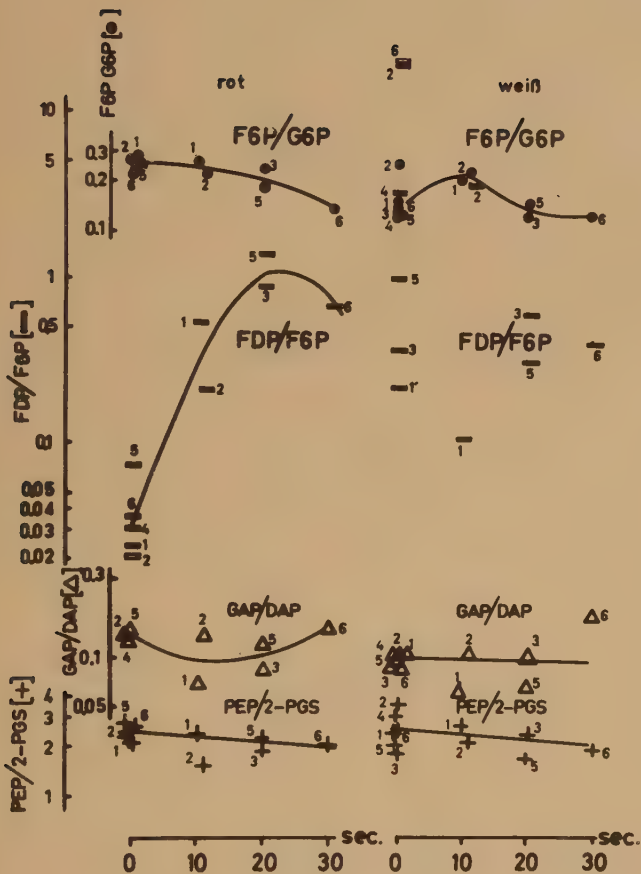


Abb. 6 Bewegungen der Quotienten F6P/G6P, FDP/F6P, GAP/DAP und PEP/2-PGS bei verschieden langer tetanischer Reizung in rotem und weißem Kaninchenmuskel. Kontrollwerte auf der Ordinate, Abszisse = Reizdauer.

Weise. Sie sind dem thermodynamischen Gleichgewicht angenähert. Die Quotientenbewegungen beim Übergang vom Kontrollstatus zur Aktion sind gering. Wenn in einigen Fällen die Quotienten im Tetanus geringfügig gegenüber der Kontrolle ansteigen statt abzusinken, so kann das verschiedene Gründe haben: 1. Die Kontrolle entspricht nicht dem wahren Ruhestatus. 2. Insbesondere die Gehalte von GAP und 2-PGS sind so niedrig, (sie liegen an der Grenze der Bestimmbarkeit), daß die Bestimmungsfehler ins Gewicht fallen können.

Beim roten Muskel erkennt man deutlich, daß der Gehaltsquotient mit der Tetanudauer weiter absinkt. Das bedeutet, daß die Flußrate sich nicht sprunghaft, sondern langsam und in dem beobachteten Zeitraum von 30 Sekunden noch ständig erhöht.

Die Kontrollquotienten der Zwei-Partner-Reaktionen liegen im Durchschnitt im roten Muskel höher als im weißen Muskel (Abb. 6). Hierdurch wird die Annahme weiter gestützt, daß die Kontrollen des roten Muskels dem wirklichen Ruhestatus näher kommen als die des weißen Muskels (s. u.).

F-6-PK-Reaktion

Abb. 6 zeigt die Bewegungen der Quotienten FDP/F6P. Im Gegensatz zu den vorstehend erörterten Zwei-Partner-Reaktionen bewegen sie sich um zwei bis drei Größenordnungen beim Übergang zum Tetanus. Hierin spiegelt sich die Funktion der F6PK-Reaktion als eines wesentlichen steuernden Prinzips der Stoffwechselkette wider. Die F6PK-Reaktion besitzt die Funktion einer Staustufe [7]. Bei der Bildung des Quotienten FDP/F6P wurden ATP und ADP, die an der Reaktion beteiligt sind, vernachlässigt:



$$\frac{[\text{FDP}] \cdot [\text{ADP}]}{[\text{F6P}] \cdot [\text{ATP}]} = k_{\text{F6PK}}$$

Die Vereinfachung des Quotienten durch Fortlassen von ATP und ADP, (die wegen ihrer Kompartimentierung (s. u.) besser durch CP und C ausgedrückt werden), ändert wenig am Ausmaß seiner Bewegungen. (Die Quotientenbewegungen wären sonst sogar noch etwas größer.)

Die Sensibilität des F6PK-Systems ist sehr groß, ganz besonders offenbar im weißen Muskel. Schon die Kontrollwerte des roten Muskels streuen erheblich im Vergleich zu den anderen Quotienten. Die Werte im Tetanus lassen aber deutlich die enorme Aktivierung der Kinase erkennen.

Die Kontrollwerte des weißen Muskels sind der stärkste Hinweis dafür, daß er in diesem Stadium nicht mehr ruhend, sondern schon erheblich gereizt ist. Die F6PK ist zum Teil sogar schon maximal aktiviert. So erklärt es sich, daß bei den Kontrollwerten der niedrigste (im roten Muskel) und der höchste Quotient FDP/F6P (im weißen Muskel) gefunden werden. Je höher der Kontrollwert im weißen Muskel liegt, desto höher liegen auch die Gehalte an den in der Stoffwechselkette folgenden Metaboliten: Dihydroxyazetonphosphat, Glyzeraldehyd-3-phosphat, 2-Phosphoglyzerinsäure und Pyruvat. Da aber die Gehalte an Glukose-6-phosphat in diesen Fällen gleichzeitig die niedrigsten der Versuche sind, ist anzunehmen, daß die F6PK-Reaktion sensibler ist als andere vorgeschaltete, geschwindigkeitsbegrenzende Reaktionen (Phosphorylase-, Hexokinase-Reaktion).

Diese Befunde zusammen mit den schon früher erwähnten, (höhere Metabolitgehalte und niedrigere Quotienten im weißen als im roten Muskel beim Kontrollstatus), lassen den weißen Muskel schon in der Kontrolle als deutlich gereizt erscheinen. Die Bewegungen des FDP/F6P - Quotienten im weißen Muskel sind deshalb nicht auswertbar.

Auch HOHORSTs "Ruhequotienten" für den Rattenbauchdeckenmuskel [21] liegen mit durchschnittlich 0,17 sehr hoch. Der Muskel befindet sich also sicherlich schon in einem erheblich gereizten Zustand.

Deshalb steigt der Quotient im Tetanus auch nur um den Faktor 4 auf 0,67 an, einen Wert, wie er ähnlich am roten Kaninchenmuskel im Tetanus bestimmt wurde.

Glukose-6-phosphat

Wie Abb. 3 zeigt, sinkt der Gehalt an Glukose-6-phosphat im roten Muskel im Tetanus gegenüber der Kontrolle leicht ab, während er im weißen Muskel stärker ansteigt. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten liefert der Vergleich der Enzymaktivitätsmuster beider Muskeln (Abb. 4). Das Verhältnis der Aktivitäten von Phosphorylase (PH) und Hexokinase (HK) beträgt 230 im weißen und 1,5 im roten Muskel (Tab. 4). Die Systemkorrelation Glukosephosphorylierung: Glykolyse (HK: GAPDH) ist im roten Muskel um den Faktor 60 größer als im weißen. PETTE [38, 39] zog daraus den Schluß, daß für den roten Muskel die Hexokinase-reaktion, für den weißen Muskel die Phosphorylasereaktion von wesentlicher Bedeutung bei der Bereitstellung von Substrat für die EMBDEN-MEYERHOF-Kette seien. Die Bewegungen der Metabolitgehalte können diese Annahme unterstützen.

Im weißen Muskel schwillt der Gehalt an Glukose-6-phosphat bei der Arbeit erheblich an, weil die Mobilisierung des Glykogens ungestört möglich ist. Im roten Muskel stammt der erhöhte Substratdurchsatz nur zu einem Teil aus abgebautem Glykogen. Der andere Teil wird durch Phosphorylierung der Blutglukose in der Hexokinase-reaktion bereitgestellt. Da dieses Reservoir im Tetanus verschlossen ist (Abbinden der A. und V. femoralis mit Reizbeginn), ist der Substratnachschieb geringer als im weißen Muskel, der Gehalt an Glukose-6-phosphat sinkt etwas ab.

	M. adductor magnus	M. soleus
GAPDH	87260	10850
PH	2800	135
HK	12	93
PH/GAPDH	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$
HK/GAPDH	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$85 \cdot 10^{-4}$
PH/HK	230	1,5

Tab. 4

Aktivitätsgehalte von GAPDH, PH und HK und Systemkorrelationen: Glykogenabbau: Glykolyse (PH/GAPDH), Glukosephosphorylierung: Glykolyse (HK/GAPDH), Glykogenabbau: Glukosephosphorylierung (PH/HK) [39].
Aktivitätsangaben in $\mu\text{Mol/h.g}$ Frischgewicht.
(PH = Phosphorylase, HK = Hexokinase, GAPDH = Glyzeraldehyd-3-phosphatdehydrogenase).

Energiereiche Phosphate

HOHORST schließt aus seinen Versuchen am Rattenbauchdeckenmuskel [21], daß im Skelettmuskel im Gegensatz zur Leber ATP und ADP in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind: Nur ein kleiner Teil des ATP wird im Tetanus schnell umgesetzt, der Quotient ATP/ADP bleibt fast konstant. Im Skelettmuskel gibt der CP/C - Quotient ein viel besseres Maß für das Potential des energiereichen Phosphats als der ATP/ADP - Quotient.

Unsere Befunde am Kaninchen können HOHORSTs Auffassung in etwa bestätigen, obwohl aus den Versuchen nur wenige Werte vorliegen. Die Konstanz des Quotienten ATP/ADP ist deutlich nur beim roten Muskel ausgeprägt. Beim weißen Muskel sinkt der Quotient im Tetanus gegenüber den Kontrollen etwas ab.

Es wurde schon früher davon gesprochen, daß im weißen Muskel trotz der geringen Zahl der Versuche eine gewisse Parallelität im Abfall des CP/C - und Anstieg des G/D - Quotienten erkennbar ist. Insoweit besteht Übereinstimmung mit HOHORSTs Befunden am Rattenbauchdeckenmuskel [21]. Der rote Muskel läßt keine derartige Parallelbewegung erkennen. Das ist vermutlich nicht nur wegen der sehr geringen Zahl von Versuchen der Fall. Vielmehr wurde schon in einem früheren Abschnitt die Überlegung angestellt, daß im atmenden Muskel, wie es der rote Muskel auch im Tetanus ist, der G/D - Quotient im wesentlichen von der Atmungskontrolle abhängig ist. Diese ihrerseits wird durch das Potential des energiereichen Phosphats ausgeübt, für das der Quotient CP/C ein Maß darstellt. Es hat den Anschein, als ob im Tetanus, solange der Muskel atmet, der Quotient auf einen gleichbleibenden neuen Wert absinkt, der der Einstellung auf einen neuen Fließgleichgewichtszustand entspricht.

Der weiße Muskel besitzt im Kontrollstatus etwa doppelt soviel ATP und dreimal soviel CP wie der rote Muskel.

Aminosäuren und Amide

Bei vier Kaninchen wurden die Untersuchungen in Zusammenarbeit mit E. KIRSTEN auch auf die Spiegel der freien Aminosäuren und Amide ausgedehnt [28]. Auch hierbei ergab sich eine deutliche Verschiedenheit von rotem und weißem Muskel (Tab. 5).

Besonders auffällig sind die hohen Spiegel von Glutamin und Glutaminsäure im roten Muskel, die um etwa eine Größenordnung über denen im weißen Muskel liegen. Der weiße Muskel weist demgegenüber rund fünffach höhere Gewebsgehalte an Glykokoll auf als der rote Muskel. Die übrigen Differenzen sind nicht signifikant.

Zweifellos spiegelt sich in den unterschiedlichen Gewebsgehalten eine verschiedene Bedeutung dieser Verbindungen für den Zellstoff-

Versuch Nr.	Tau	Ha	Met-SO	Asp	Thre	Ser	Glu	GluNH	Pro	Gly	Ala
M. adductor magnus (weiß)											
Kontrollstatus											
1	0,21	16,3	0,20	0,03	0,19	0,21	0,37	0,78	0,80	2,40	0,77
3	1,51	21,0	0,27	0,02	0,27	0,37	0,31	1,59	0,39	4,52	0,39
4	0,77	7,0	0,27	0,02	0,07	0,25	0,27	0,55	0,78	2,08	0,92
5	0,82	12,5	0,24	0,01	0,18	0,37	0,13	1,50	0,28	4,33	0,41
MW	0,82	14,2	0,24	0,02	0,17	0,30	0,27	1,10	0,56	3,33	0,62
bei Tetanus											
1	0,68	13,5	0,07	0,01	0,15	0,45	0,19	1,69	1,15	8,04	2,00
3	0,12	16,6	0,06	0,04	0,09	0,14	0,54	0,45	0,25	2,06	0,31
4	0,13	4,4	0,15	0,16	0,12	0,26	0,28	2,07	0,49	2,59	0,98
5	0,90	10,5	0,22	0,12	0,19	0,32	0,12	1,40	0,66	4,60	0,48
MW	0,45	11,25	0,12	0,08	0,14	0,29	0,28	1,40	0,64	4,19	0,94
M. semitendinosus (rot)											
Kontrollstatus											
1	1,37	22,4	0,28	0,05	0,17	0,76	2,15	7,39	0,75	0,76	1,89
3	1,10	18,8	0,75	0,01	0,15	0,38	1,81	11,4	0,59	0,62	0,65
4	0,91	12,2	0,21	0,08	0,27	0,31	0,99	5,68	0,29	0,69	0,98
5	0,86	13,4	0,56	0,18	0,14	0,27	1,71	9,13	0,59	0,70	0,74
MW	1,06	16,7	0,45	0,08	0,18	0,43	1,66	8,4	0,55	0,69	1,06
bei Tetanus											
1	1,11	18,5	-	0,13	0,26	0,73	2,44	6,81	0,74	0,76	1,76
3	0,92	18,7	0,59	0,19	0,20	0,16	2,96	9,26	0,28	0,74	0,73
4	0,64	12,4	0,40	0,14	0,31	0,37	3,27	7,95	0,78	1,37	1,61
5	1,52	24,0	0,59	0,21	0,22	0,74	1,90	13,0	2,70	0,65	0,83
MW	1,16	17,7	0,56	0,19	0,23	0,47	2,58	9,78	1,18	0,82	1,15

Tab.: 5 Freie Aminosäuren in Kaninchen-Skelettmuskeln
(Daten in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht)
MW = Mittelwerte. Ha = Harnstoff.
Met-SO = Methioninsulfoxyd.

wechsel der beiden Muskeln wider. Die Rolle der Aminosäuren im metabolischen Geschehen läßt sich bisher nur mangelhaft abschätzen. Manche von ihnen sind sicher von wesentlicher Bedeutung. Sie sind mit dem Weg des energiereichen Stoffwechsels durch mehrere Enzyme verbunden (z. B. GluDH, GOT, GPT) und liegen, was man nicht übersehen darf, zum Teil in ihren Gehalten größenordnungsmäßig weit über denen vieler Metabolite des Glukoseabbaues. Die besondere Funktion des Glutamins und der Glutaminsäure im roten Muskel läßt sich außer an den besonders hohen Gewebsspiegeln auch daran ablesen, daß die Aktivität der GluDH im roten Muskel etwa zehnmal höher liegt als im weißen Muskel [38, 40].

M e t h o d i k

Kaninchenrasse

Es wurden Kaninchen der Rasse "Deutsche Widder" für die Untersuchungen verwandt. Von Kaninchen dieser Rasse wurden auch die Enzymaktivitätsmuster des roten und weißen Skelettmuskels bestimmt [40].

Narkose

Die Versuchstiere wurden i.a. durch intraperitoneale Injektion einer 20%-igen Urethanlösung narkotisiert. Zur Erzielung einer ausreichenden Narkosetiefe waren durchschnittlich 1,5 g/kg Urethan erforderlich. 15 bis 30 Minuten nach der Injektion des Narkotikums konnte mit der Operation begonnen werden.

Auch eine Äthernarkose wurde versucht. Die Kaninchen erwiesen sich jedoch gegen Äther als außerordentlich empfindlich und starben meist vor Ende des Versuchs. Selbst bei Anwendung einer Äther-Lachgas-Narkose mit künstlicher O₂-Beatmung über eine Trachealkanüle und Gaben von Atropin s.c. und Succinylcholin i.v. (zur Verringerung der Narkosetiefe) war der Kreislauf der Tiere bei Versuchsende zum Teil in sehr schlechtem Zustand (Zyanose, schlechte Herzaktion).

Die Versuchsdauer bis zur Probenentnahme betrug etwa 1½ bis 2 Stunden.

Operation

Das narkotisierte Kaninchen wurde in Rückenlage auf einen einfachen Operationstisch gespannt. Von der Innenseite der Oberschenkel wurden die Haare weitgehend entfernt. Durch einen Längsschnitt

wurde die Haut der Oberschenkelinnenseite gespalten, dann losgelöst und zurückgeklappt. Nach Durchtrennung des dünnen und breiten *M. gracilis* in seinem distal-anterioren Teil lag der *M. adductor magnus* als vom Tuber ischii zum unteren Femurende und zum Condylus medialis tibiae ziehendes breites Muskelband frei. In der Mitte dieses Muskels schimmerte der in gleicher Richtung ziehende *M. semitendinosus* rot durch. Hier wurde der Adductor magnus in Längsrichtung gespalten, indem seine Fasern durch zwei chirurgische Pinzetten sehr vorsichtig getrennt wurden. Dabei ließ sich eine mäßig starke blutige Durchtränkung der den Spalt begrenzenden Anteile des Adductor magnus nicht vermeiden. Die Innenseite des Semitendinosus wurde freipräpariert. Der vordere Teil des Adductor magnus wurde dann unterfahren und mit zwei Bändern umschlungen. Es wurde stets Sorge getragen, daß die zwischen Adductor magnus und Semitendinosus verlaufenden Gefäße nicht durchtrennt wurden.

Beide Beine wurden nacheinander präpariert. Das Operationsfeld wurde nach der Präparation mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet, mit Mull und Kunststoffolie abgedeckt und mit einer Lampe vorsichtig gewärmt. Nach beendeter Operation wurde bis zur Probenentnahme etwa 10 Minuten gewartet.

Probenentnahme

Zur Probenentnahme wurde eine besondere Zange gebaut (Abb. 7). Sie besteht aus zwei Teilen, die miteinander über einen Stift verbunden werden können. Der untere Teil der Zange besteht aus festem Stahlband von 3 cm Breite und trägt den Stift. Der obere Teil trägt vorn an einem Stiel einen Aluminiumblock mit einer Bohrung für den Stift. Der Block besitzt an seiner Oberseite eine wannenförmige Vertiefung zur Aufnahme von flüssigem Stickstoff.

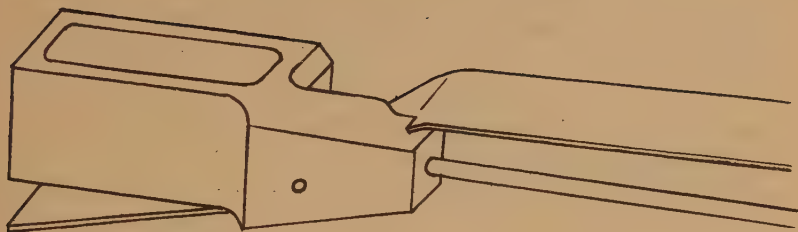


Abb. 7

Entnahmezange

Von jedem Kaninchen wurden erst ein "Kontrollwert" von einem Bein, dann ein "Reizwert" vom anderen Bein entnommen.

Der Reiz bestand aus einem Tetanus von 10 bis 30 Sekunden Dauer. Zur Reizerzeugung diente ein S 6 Stimulator (Grass, Medical Instruments, Quincy, Mass., U.S.A.). Bei einer Spannung von 28 V betrugen die Reizfrequenz 100/sec und die Reizdauer 6 msec. Als Reizelektroden dienten zwei Pinzetten, die an den Enden der beiden Muskeln angelegt wurden.

Der Adductor magnus ließ sich von seiner hinteren Kante her leicht unterfahren, da der Raum zwischen ihm und dem darunter liegenden Muskel nur mit lockerem Bindegewebe gefüllt ist. In dieses Fach wurde der auf Körpertemperatur erwärmte untere Teil der Entnahmezange eingeführt. Der obere Zangenteil wurde in flüssigem Stickstoff gekühlt und dann mit dem bereits liegenden unteren Teil verbunden. Bis zum Zusammendrücken der Zange wurden die Muskeln gegen die abströmende kalte Luft abgedeckt. Gleichzeitig mit der Entfernung des Kälteschutzes wurden die um den vorderen Teil des Adductor magnus geschlungenen Bänder angezogen und dadurch der Semitendinosus breit freigelegt. Sofort nach dem Zusammenpressen der Zange wurde in die Vertiefung im Aluminiumblock flüssiger

Stickstoff mit einem Schöpflöffel nachgefüllt. Gleichzeitig wurde mit wenigen Schlägen einer kräftigen Verbandschere das von der Zange gefaßte Gewebe herausgeschnitten. Zange und Gewebe wurden danach sofort in flüssigen Stickstoff getaucht.

Bei der Entnahme des Reizwertes wurde die Zange erst kurz vor Schluß der Reizung zusammengesetzt. Mit Beginn der Reizung wurden gleichzeitig die freigelegten A. und V. femoralis abgeklemmt, um Zu- und Abstrom von Metaboliten über die Blutbahn zu verhindern.

Die Entnahme der Proben und ihre weitere Verarbeitung wurden aus dem Verfahren entwickelt, das BÜCHER und Mitarbeiter für die Metabolitbestimmung in Lebergewebe [8] angegeben haben. Dieses Verfahren wiederum fußt auf verschiedenen anderen Arbeiten [z. B. 15, 20, 22, 50].

Verarbeitung der Proben bis zur Extraktion

Die mit der Zange gefaßten Gewebeproben waren mit umgebendem Muskelgewebe herausgeschnitten worden. Mit einem Zahnarztbohrer wurden unter flüssigem Stickstoff diese Gewebspartien abgetrennt. Auf der Oberfläche der Probe hoben sich roter und weißer Muskel gut gegeneinander ab und wurden auseinandergeschnitten, wobei die während der Präparation gequetschten blutigen Anteile des Adductor magnus verworfen wurden. Die so erhaltenen flachen Scheiben von rotem und weißem Muskel wurden, ohne daß die oberen Schichten auftauen konnten, auf einen Objekthalter eines Gefriermikrotoms aufgefroren. Bei -20 bis -25°C wurden Schnitte von $10\text{ }\mu$ Dicke bis zu einer Tiefe von 500 bis $600\text{ }\mu$ gewonnen. Je nach Größe der Probe ergab das Gewebsmengen von durchschnittlich 60 bis 120 mg . Die Wägung erfolgte auf einer Torsionswaage, die in der gleichen Tiefkühltruhe wie das Mikrotom stand. Die Gewebsschnitte wurden bis zur Extraktion unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

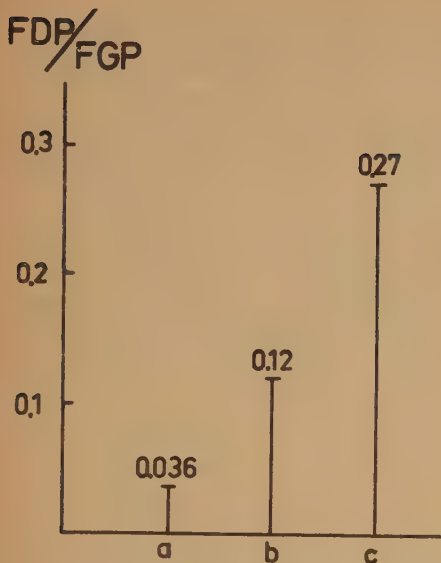


Abb. 8

Demonstration der Durchfrier-
geschwindigkeit in den tieferen
Gewebsschichten anhand des
Quotienten FDP/F6P (roter Muskel
Kontrollwert)

Schnitttiefe:

- a = 0-6000 μ
- b = 600-1000 μ
- c = 1000-1400 μ

Die Schnitttiefe muß gering bleiben, da nur in der obersten Schicht des von der Zange gefaßten Gewebes die Durchfriergeschwindigkeit groß genug ist, um den gewünschten Stoffwechselstatus momentan einzufrieren. Wie Abb. 8 an dem besonders eindrucksvollen Beispiel des FDP/F6P-Quotienten demonstriert, können die Metabolitbewegungen in den tieferen Schichten bis zur Kältefixierung noch erheblich sein. Abweichungen der Kontrollwerte von den wahren Ruhewerten können zum Teil auch darauf beruhen, daß geringe Metabolitbewegungen bis zum Frierstopp auch schon in der Schicht bis 600 μ erfolgt sind.

Extraktion

Es wurde zweimal extrahiert, erst mit 0,5 ml 6%-iger Perchlorsäure, dann mit 0,5 ml 3%-iger Perchlorsäure. Die Gewebsschnitte wurden in der Tiefkühltruhe bei -20 bis -25°C im Extraktionsgefäß mit der 6 %-igen Perchlorsäure von gleicher Temperatur

versetzt und mit einem Glasstab vermischt. Zur Gefrierpunktserniedrigung enthielt die 6 %-ige Perchlorsäure 25 % Methanol.

Von mehreren Extraktionsverfahren war das mittels Ultraschalls das beste. Das Ultraschallgerät "Sonifier-Branson - S 75" mit normaler Schallspitze wurde verwendet. Als Extraktionsgefäße dienten Spinco-Zentrifugenhülsen aus gehärteter Gelatine, deren Durchmesser 2 bis 3 mm größer war als der der Schallspitze. Während der Extraktion wurde das Extraktionsgefäß durch Eiswasser gekühlt. Beim ersten Extraktionsgang wurde während 5 Minuten alle 2 bis 5 Sekunden für höchstens 1 Sekunde bei höchster Energiestufe beschallt. (Die Kontrolle mit einem Thermoelement zeigte, daß die Temperatur des Gemisches nicht über 20°C anstieg.) Die Muskelfasern wurden dabei zu einer homogenen Suspension zerrissen. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in gleicher Weise 1 Minute lang mit 0,5 ml 3 % HClO_4 nachextrahiert. Die Überprüfung ergab, daß die erste Extraktion praktisch vollständig war. Im Sediment wurden ca. 0,1 ml Extrakt zurückgehalten, so daß der Metabolitverlust nach der zweiten Extraktion weniger als 5 % betrug. Die vereinigten Extrakte wurden nochmals in einer Misco-Zentrifuge bei höchster Tourenzahl zentrifugiert. Unter Eiskühlung und Magnetührung wurde der saure Extrakt dann mit 1n-Kalilauge langsam auf ca. $\text{pH} = 5-6$ gebracht. Vom Kaliumperchlorat-Niederschlag wurde wie oben in der Misco abzentrifugiert.

Substratbestimmungen

Die Substrate wurden durch optische Tests nach H. U. BERGMAYER [3] bestimmt, i. a. nach den von HOHORST angegebenen Methoden [vgl. auch 22].

Die Substratgehalte lagen zum Teil an der Grenze der Bestimmbarkeit, (Glyzeraldehyd-3-phosphat, 2-Phosphoglyzerinsäure, Phosphoenolpyruvat). Für die Breite des Registrierpapiers mußte häufig

eine Extinktionsdifferenz von 0,1 gewählt werden. Außerdem wurden, außer für den Laktattest, Küvetten mit 5 cm Schichtdicke und 4 mm lichter Weite verwendet. Zur Befreiung von feinsten Stoffen wurden die Testansätze zentrifugiert. Um ein Verdunsten des Küvetteninhaltes zu vermeiden, wurde mit Hexan überschichtet.

Bei der hohen Verstärkung, mit der registriert wurde, zeigten viele Tests eine weitere kontinuierliche Zu- oder Abnahme der Extinktion. Durch Anlegen der Tangente wurde der Endwert der Reaktion als Schnittpunkt mit der Startlinie erhalten. Um die Tangente exakt legen zu können, mußten die Tests länger als sonst üblich [vgl. z. B. 22] laufen.

In je einem Testansatz wurden bestimmt:

1. Laktat,
2. Glycerin-1-phosphat,
3. Dihydroxyazetonphosphat, Pyruvat, Glycerinaldehyd-3-phosphat, Fruktose-1, 6-diphosphat, Phosphoenolpyruvat, 2-Phosphoglycerinsäure,
4. Glukose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat, Adenosintriphosphat, Kreatinphosphat,
5. Adenosindiphosphat, Kreatin.

Laktat-Test

HOHORST [22] bestimmt Laktat, Glycerin-1-phosphat (und Malat) in einem Testansatz. Bei den hier vorliegenden kleinen Metabolitmengen war dieses Verfahren nicht anwendbar. Die Testmischung aus Puffer, DPN und H_2O ohne Extraktzusatz zeigt nach Zusatz von LDH eine Reaktion wie bei Anwesenheit von Laktat. Eine Verunreinigung der verwendeten Substanzen mit Laktat konnte ausgeschlossen werden, ebenso eine Verunreinigung durch Laktat auf anderem Wege. Die Extinktionsänderung nach Laktatzusatz nimmt mit dem Alter des Puffers zu. In Tab. 6 wird hierfür ein Beispiel gegeben. Dieses bisher ungeklärte Phänomen wurde auch von anderen Autoren beobachtet (vgl. z. B. H. HOLZER und H. D. SÖLING [24]).

Reihen- folge der Versuche	Testzusammensetzung	Zusätze nach Start des Tests	Extink- tions- diffe- renz nach d. Zusatz	Errech- neter Laktat- gehalt
1.	0,485 ml H ₂ O, 0,4 ml Hydrazin-Glykokoll- Puffer [3], 0,015 ml DPN (100 mg/ml)	a) 0,005 ml LDH b) 0,025 ml Standard- Laktatlösung	0,030 0,480	14 mM 216 mM
2.	wie bei 1.	a) 0,025 ml Standard- Laktatlösung b) 0,005 ml LDH	- 0,516	- 233 mM
3.	wie bei 1.	a) 0,005 ml LDH b) 0,025 ml Standard- Laktatlösung	0,042 0,474	19 mM 214 mM
4.	wie bei 1.	a) 0,005 ml LDH b) 0,025 ml Standard- Laktatlösung	0,090 0,482	41 mM 217 mM

Tab. 6: Demonstration des Blindablaufs beim Laktattest nach Zusatz von LDH im Leerversuch.

Schichtdicke: 1 cm,

Registrierpapierbreite: $\Delta E = 0,25$

Wegen dieser Unsicherheit der Bestimmung wurde der Test in folgender Weise modifiziert. Etwa eine Stunde vor Durchführung des Tests wurde eine Mischung von 0,65 ml Hydrazin-Glykokoll-Puffer [3, 22], 0,7 ml H₂O, 0,02 ml DPN (100 mg/ml) und 0,01 ml LDH angesetzt. Für den Test wurde 0,9 ml der zentrifugierten Mischung in eine normale Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm pipettiert. Es wurde zunächst bis zur Konstanz der Extinktion geschrieben. Bei schnellem Vorschub des Registrierpapiers (2cm/min) wurden

25 bis 60 μ l Extrakt auf einem Spatel eingebracht und rasch eingemischt. Nach 2 bis 4 Minuten wurde die Papiergeschwindigkeit wieder auf die normale Geschwindigkeit von 0,5 cm/Minute zurückgestellt. Der Beginn der Kurve ließ sich wegen des relativ flach verlaufenden Anfangsstückes gut auf die Startlinie zurückverlängern. Ein Beispiel ist in Abb. 9 wiedergegeben. Je nach der zu erwartenden Extinktionsdifferenz wurde für die Breite des Registrierpapiers ein ΔE von 0,25, 0,5 oder 1,0 gewählt.

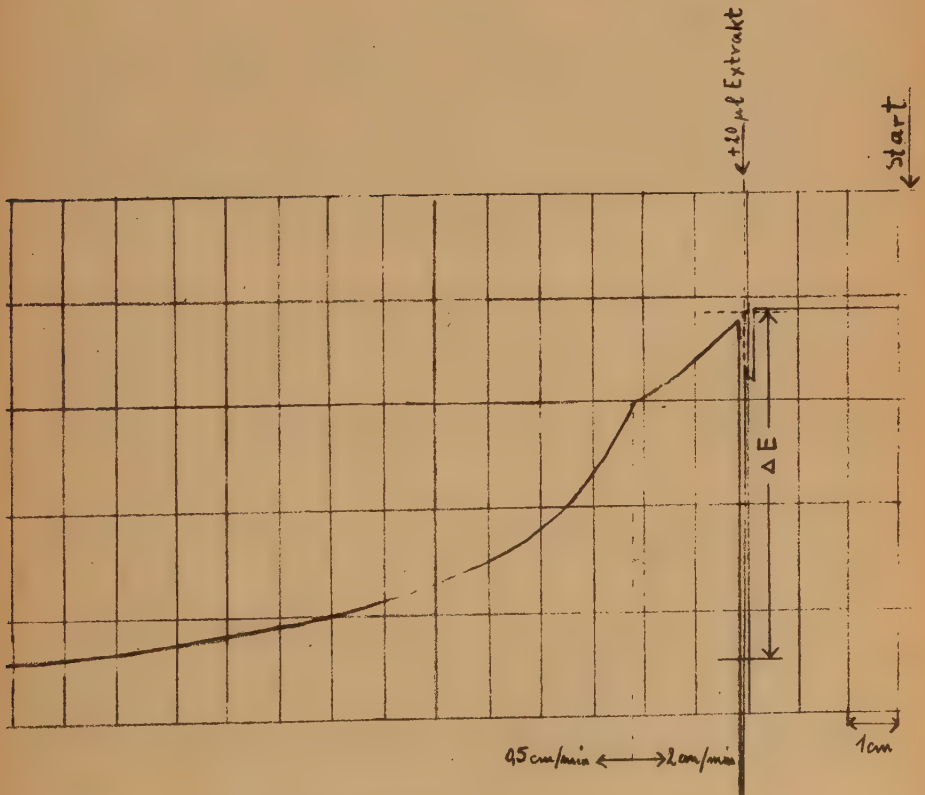


Abb. 9 Laktatbestimmung

Z u s a m m e n f a s s u n g

Am extrem roten M. semitendinosus und am extrem weißen M. adductor magnus am Hinterlauf des Kaninchens wurden die Unterschiede im metabolischen Verhalten untersucht, nachdem früher PETTE und BÜCHER [40] charakteristische Unterschiede im Enzymaktivitätsmuster roter und weißer Muskeln (Abb. 4) aufgezeigt hatten. Hierzu wurden die Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels am ruhenden Muskel als "Kontrollen" und nach verschieden langer tetanischer Reizung bestimmt.

Die größten Differenzen bestehen im Bereich der extramitochondrialen Redoxsysteme. Der weiße Muskel glykolyisiert im Tetanus. Durch gleichzeitigen Pyruvatanstieg bleibt das Laktat-Pyruvat-Potential praktisch konstant. Mit dem Pyruvat steigt das Glyzerin-1-phosphat stöchiometrisch an (Pyruvat-Glyzerin-1-phosphat-Dismutation). Das Potential Glyzerin-1-phosphat/Dihydroxyazetonphosphat sinkt im Tetanus nach kurzem Anstieg ab.

Der rote Muskel atmet während der beobachteten Zeit des Tetanus (10 bis 30 Sekunden). Bei relativ geringem Laktatanstieg wird der Pyruvatgehalt erniedrigt. Die so errechneten Potentiale sind die negativsten bisher an Muskeln bestimmten. Dagegen wird das System Glyzerin-1-phosphat/Dihydroxyazetonphosphat erheblich positiviert.

Die Potentiale der Systeme Laktat/Pyruvat und Glyzerin-1-phosphat/Dihydroxyazetonphosphat liegen in den Kontrollen dicht beieinander.

Der Einfluß des Potentials des energiereichen Phosphats auf das Potential des cytoplasmatischen DPN-Systems wird diskutiert. Bei Aerobiose überwiegt die kontrollierende Wirkung des energiereichen Phosphats auf die Atemkette, bei Anaerobiose der Einfluß auf die GAPDH- über die PK-Reaktion.

Es wird erörtert, daß die Hexokinase-Reaktion im roten Muskel bei der Bereitstellung von "Brennstoff" von großer Bedeutung ist, während im weißen Muskel für diese Aufgabe fast nur die Phosphorylase zuständig ist.

Die F6PK-Reaktion wird als äußerst wirksames steuerndes Prinzip bestätigt. Das Ausmaß der Bewegungen des Quotienten FDP/F6P ist mit 2 bis 3 Größenordnungen weit größer, als bisher bestimmt wurde.

Sehr deutliche Unterschiede zeigen weißer und roter Muskel im Gehalt an einigen freien Aminosäuren.

HOHORSTs Ergebnisse am Bauchdeckenmuskel der Ratte werden zum Vergleich herangezogen. Die Diskrepanzen zu unseren Ergebnissen dürften vorwiegend zwei Gründe haben: 1. HOHORSTs "Ruhewerte" entsprechen bereits einem Reizzustand. 2. Der Bauchdeckenmuskel der Ratte ist ein Muskel mit "roten" und "weißen" Anteilen, bei dem allerdings die letzteren überwiegen.

Die Untersuchungen bestätigen, was bereits PETTE und BÜCHER aus dem Enzymaktivitätsmuster ablesen konnten: die kontinuierliche und tonische Funktion des roten Muskels wird vorwiegend durch Zellatmung, die diskontinuierliche und tetanische Funktion des weißen Muskels vorwiegend durch Glykolyse getragen. Die Differenzen im Metabolismus entsprechen weitgehend den Differenzen zwischen weißem und rotem Muskel im Enzymaktivitätsmuster.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Gefäßversorgung von *M. adductor magnus* und *M. semitendinosus* untersucht.

Im methodischen Teil waren ein Operationsverfahren und ein Verfahren zur Entnahme der Gewebsproben zu entwickeln, außerdem ein Extraktionsverfahren. Schließlich waren die üblichen optischen Tests zur Substratbestimmung den geringen Substratmengen anzupassen.

Literaturverzeichnis

1. BATELLI, F., L. STERN: Biochem. Z. 46, 317 (1912)
2. BEATTY, C.H., R.D. PETERSON, R.M. BOCEK: Am. J. Physiol. 204, 939 (1963)
3. BERGMAYER, H.U.: "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim/Bergstr. (1962)
4. BIEDERMANN, W.: "Elektronenphysiologie" Gustav Fischer, Jena (1895)
5. BÜCHER, Th., M. KLINGENBERG: Angew. Chemie 70, 552 (1958)
6. BÜCHER, Th.: S.B. Ges. Beförd. ges. Naturwiss. Marburg 83/84, 383 (1963)
7. BÜCHER, Th., W. RÜSSMANN: Angew. Chemie 75, 881 (1963)
8. BÜCHER, Th., K. KREJCI, W. RÜSSMANN, H. SCHNITGER, W. WESEMANN in: "Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry", Academic Press Inc., New York (1964)
9. DAVEY, C.L.: Nature 179, 211 (1957)
10. DAVEY, C.L.: zit. nach l. c. 37
11. DOMONKOS, J.: A. B. B. 95, 138 (1961)
12. DOMONKOS, J., L. LATZKOVITS: A. B. B. 95, 144 (1961)
13. DUNCKER, H.R.: 9. Arbeitstagung der gemeinnützigen Vereinigung der Präparatoren und Dermoplastiker Deutschlands e.V., Bonn 1964, (Vortragsmanuskript).
14. DUNCKER, H., O. SCHLÜTER: Der Präparator 10, 49 (1964)
15. ERÄNKÖ, O.: Acta anat. 22, 331 (1954)
16. FLETCHER, W.M.: J. Physiol. 47, 361 (1913-14)
17. GLEISS, W.: Arch. ges. Physiol. 41, 256 (1887)
18. GRÜTZNER, P.: Rec. zool. Suisse 1, 665 (1884)
19. HÄGGQUIST, G. in: Handbuch der Mikroskop. Anatomie des Menschen, Bd. 2, Teil 3: "Die Gewebe". Ed. W. v. MÖLLENDORFF, Springer, Berlin (1931)
20. HOHORST, H.J.: Dissertation, Marburg (1960)

21. HOHORST, H.J. in "Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle", Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)
22. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ, Th. BÜCHER: Bio. Z. 332, 18 (1959)
23. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ, M. REIM: BBRC 4, 163 (1961)
24. HOLZER, H., H.D. SÖLING: Bio. Z. 336, 201 (1963)
25. KLARWEIN, U., W. LAMPRECHT, E. LOHMANN: HOPPE SEYLERs Z.f. physiolog. Chem. 328, 41 (1962)
26. KLINGENBERG, M., Th. BÜCHER: Ann. Rev. Biochem. 29, 669 (1960)
27. KLINGENBERG, M., Th. BÜCHER: Bio. Z. 334, 1 (1961)
28. KRIEG, U., E. KIRSTEN: Bio. Z. 341, 534 (1965)
29. KRÜGER, P.: Anat. Anz. 98, Erg. H., 65 (1951)
30. KRÜGER, P.: "Tetanus und Tonus der quergestreiften Skelettmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen" Akad. Verlagsges. Geest & Portig K.G., Leipzig (1952)
31. LAWRIE, R.A.: B.J. 55, 298 (1953)
32. LAWRIE, R.A.: B.J. 55, 305 (1953)
33. CHING-YUEN LEE, J.: Anat. Rec. 132, 597 (1958)
34. MILLIKAN, G.A.: Proc. Roy. Soc. 123, 218 (1937)
35. MIRSKI, A., E. WERTHEIMER: B. J. 36, 221 (1942)
36. NOLL, A., M. BECKER: Bio. Z. 287, 88 (1936)
37. PERRY, S.V. in: "Comparative Biochemistry", (Eds. M. FLORKIN und H.S. MASON), Vol. 2, 245, Academic Press, New York (1960)
38. PETTE, D.: Naturwiss. 52, 597 (1965)
39. PETTE, D.: "Energieliefernder Stoffwechsel des Muskels unter zellphysiologischem Aspekt", Symposium ERB Springer, Heidelberg, im Druck
40. PETTE, D., Th. BÜCHER: HOPPE-SEYLERs Z. f. physiolog. Chem. 331, 180 (1963)
41. RANVIER, L.: Compt. rend. hebdomadaire des Séances acad. sci. 77, 1030 (1874); Arch. Physiol. norm. et path., Paris 1, 5 (1874); Arch. Physiol. norm. et path., Paris 1, 446 (1874); Leçons d'anatomie générale sur le système musculaire, Paris (1880)

- 42. SCHIMASSEK, H.: Bio. Z. 336, 460 (1963)
- 43. SCHIMASSEK, H.: Bio. Z. 336, 468 (1963)
- 44. SCHLÜTER, O.: Der Präparator 7, 177 (1961)
- 45. SMITH, R.D., R.P. GIOVACCHINI: Acta anat. 28, 342 (1956)
- 46. SPALTEHOLZ, W.: Abh. sächs. Ges. Wiss., phys.-math. Kl.,
509 (1888)
- 47. SPALTEHOLZ, W.: "Über das Durchsichtigmachen von menschli-
chen und tierischen Präparaten und seine
theoretischen Bedingungen." S. Hirzel, Leip-
zig, 2. Aufl. (1914)
- 48. WATZKA, M.: Z. mikrosk. anat. Forsch. 45, 668 (1939)
- 49. WEBER, H.H., K. MEYER: Bio. Z. 266, 137 (1933)
- 50. WOLLENBERGER, A., E.G. KRAUSE, B.E. WAHLER: Naturwiss. 45,
294 (1958)

Diese Arbeit entstand im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Theodor BÜCHER.

Herrn Professor BÜCHER danke ich für das Thema und für die vielfache und großzügige Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die umfassende Diskussion bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. PETTE, jetzt Physiologisch-Chemisches Institut der Universität München, danke ich für sein reges Interesse an der Arbeit, für seine Hilfe und seine Anregungen.

Herrn Professor HORSTMANN danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit bot, meine anatomischen Untersuchungen im Anatomischen Institut der Universität Hamburg durchzuführen.

Herrn Dr. DUNCKER und Herrn Oberpräparator SCHLÜTER, Anatomisches Institut der Universität Hamburg, danke ich für ihre bereitwillige und großzügige Hilfe bei der Durchführung der anatomischen Untersuchungen.

Frau Dr. KIRSTEN, jetzt Physiologisches Institut der Freien Universität Berlin, danke ich für die Bestimmung der Aminosäuren.

Herrn Dr. BEETZ und Mitarbeitern, Physiologisches Institut der Universität Marburg, danke ich für mehrfache Hilfe bei der Narkose der Versuchstiere.

